

Avaliação dos níveis de infecção por *Babesia bigemina* em amostras de sangue de bezerros usando qPCR com sistema de sondas de hidrólise

Marília Dal Ri Martins¹; Hayala Carolina Silva Ferreira Gomes²; Yngrid Karina Veltroni³; Pamella Cristini Silva¹; Maria Fernanda Tonelli¹; Henrique Nunes de Oliveira²; Cintia Hiromi Okino ; Márcia Cristina de Sena Oliveira⁴

¹Curso de graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, São Carlos, SP, marilia.dalri@gmail.com

²Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, Brasil.

³Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

⁴Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Babesia bigemina é um hemoparasita de bovinos endêmico no Brasil, transmitido pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*. As reações em cadeia da polimerase quantitativas (qPCR) usando corantes intercalantes têm sido usadas nas estimativas dos níveis de infecção nas amostras de sangue dos animais. Porém, o uso das sondas de hidrólise Taqman pode aumentar a especificidade das reações. Assim este experimento teve a finalidade de padronizar a técnica para a quantificação do número de cópias do DNA de *B. bigemina* usando as sondas de hidrólise. As quantificações foram testadas usando uma sonda de hidrólise contendo FAM-ACTGAGGTTAATATGGGTTGGGCACT-BHQ1, na concentração de 2,5 μM e o tampão HOT FIREPol Probe Universal qPCR Mix (Solis BioDyne, Estônia). Foram desenhados primers que flanqueiam parte do gene do citocromo b mitocondrial de *B. bigemina* e produz amplicons com 98pb. Várias concentrações de DNA extraído de sangue de bezerros e reagentes foram testadas e os melhores resultados foram conseguidos usando para 102 reações de 10 μL : Master mix 204 μL , 51 μL (5 μM) de cada primer (5 μM) 51 μL , Sonda 102 μL (2,6 μM) e 408 μL água ultrapura. As amostras foram analisadas em termociclador CFX96 (Biorad), com o seguinte perfil térmico: 98°C por 2 m; 40 ciclos de 98°C, por 5 s, 53°C, por 10 s, 60°C, por 20 s. Cada amostra foi analisada em duplicata e aquelas cujo desvio entre os Cqs ultrapassou de 0,5, foram reanalisadas. Para construção da curva de calibração, foram usadas diluições seriadas de razão constante igual a 10 de DNA sintético – gBlocks® Gene Fragments (IDT) contendo a sequência alvo de *B. bigemina* (nt 135-356 – número de acesso: GQ214234.1). Para cada fragmento gBlocks® foram usados 7 pontos de diluições que permitiram um intervalo de detecção e/ou quantificação do hemoparasita. A disponibilidade destas sondas permitiu o desenvolvimento de um método de quantificação em tempo real com algumas vantagens em relação ao método anteriormente usado, como maior sensibilidade e especificidade. Conclui-se que o uso de uma sonda com atividade 5'-3' exonucleásica, que impede a extensão de primers que não específicos foi responsável pela maior especificidade.

Apoio financeiro: Embrapa 12.17.00.005.00.00, FAPESP n. 2016/07216-7

CNPq/ PIBIC processo n.127313/2019-2.

Área: Produção animal.

Palavras-chave: qPCR, *Babesia bigemina*, babesiose, sonda de hidrolise.

Número Cadastro SisGen: AD22351